sebia

HYDRAGEL 7 HR *Violet Acide / Acid Violet*

Ref. 4102

HYDRAGEL 15 HR *Violet Acide / Acid Violet*

Ref. 4122

HYDRAGEL 7 HR *Amidoschwarz / Amidoblack*

Ref. 4105

HYDRAGEL 15 HR *Amidoschwarz / Amidoblack*

Ref. 4125

IVD

CE

2009/05

ESPECIFICACIONES DE USO

Los kits HYDRAGEL 7 HR e HYDRAGEL 15 HR (HR, Alta Resolución) están diseñados para el multifraccionamiento de las proteínas séricas humanas o de las proteínas de otros fluidos biológicos (orina o líquido cefalorraquídeo, LCR) mediante electroforesis en geles de agarosa tamponados alcalinamente (pH 8.6). Se utilizan junto con el instrumento semiautomático HYDRASYS. Las proteínas separadas se tiñen con una solución de violeta ácido. El exceso de tinción se elimina con una solución ácida. Los geles teñidos y secados pueden ser interpretados visualmente para la detección de anormalidades en el patrón electroforético.

Cada gel de agarosa está destinado para procesar:
- 7 muestras en el kit HYDRAGEL 7 HR,
- 15 muestras en el kit HYDRAGEL 15 HR.

Para Uso Diagnóstico *In Vitro.*

PRINCIPIO DEL TEST

La electroforesis de proteínas es una técnica bien establecida que se usa rutinariamente en los laboratorios clínicos para la investigación de anormalidades proteicas en suero y otros fluidos biológicos. Está basada en el principio de la electroforesis de zona realizada en un medio de soporte adecuado. La agarosa ha sido desarrollada para obtener un medio de soporte versátil y efectivo. Aunque la mayoría de laboratorios clínicos están satisfechos con el «tradicional» patrón de cinco bandas de las proteínas séricas, las técnicas de alta resolución pueden proporcionar información adicional para el diagnóstico.
En los geles HYDRAGEL 7/15 HR, las proteínas séricas, las urinarias o las del LCR se separan en unas diez fracciones. Cada fracción contiene una o más proteínas.
La composición del gel y la elección del colorante permiten una resolución excelente y una elevada sensibilidad, particularmente en la zona gamma. El HYDRAGEL 7/15 HR es un ensayo cualitativo.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS EN LOS KITS HYDRAGEL 15 HR E HYDRAGEL 7 HR

ARTÍCULO	PN 4102	PN 4122	PN 4105	PN 4105
Geles de Agarosa (listos para su uso)	10 geles	10 geles	10 geles	10 geles
Esponjas Tamponadas (listas para su uso)	10 bolsas de 2	10 bolsas de 2	10 bolsas de 2	10 bolsas de 2
Diluyente del colorante (solución stock)			1 vial, 60 ml	1 vial, 60 ml
Colorante Negro Amido (solución stock)			1 vial, 20 ml	1 vial, 20 ml
Colorante Violeta Acido (solución stock)	1 vial, 75 ml	1 vial, 75 ml		
Aplicadores (listos para su uso)	1 caja de 10 (7 dientes)	1 caja de 10 (15 dientes)	1 caja de 10 (7 dientes)	1 caja de 10 (15 dientes)
Papeles de Filtro	1 bolsa de 10	1 bolsa de 10	1 bolsa de 10	1 bolsa de 10

PARA OBTENER RESULTADOS ÓPTIMOS :

Los elementos de un mismo kit deben utilizarse conjuntamente y según las instrucciones incluidas.

LEER ATENTAMENTE LAS INSTRUCCIONES.

1. GELES DE AGAROSA

Preparación

Los geles de agarosa están listos para su uso. Cada gel contiene: agarosa, 8.0 g/l ; tampón tris-barbital pH 8.6 ± 0.1 ; aditivos, inocuos a las concentraciones utilizadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ATENCIÓN: Los geles de agarosa contienen barbital 0.18 %. ¡No ingerir! ¡Si se ingiere consultar al médico inmediatamente!

Uso

Medio de soporte para la electroforesis de proteínas.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacenar los geles en posición horizontal en sus recipientes protectores originales a temperatura ambiente (15 a 30 °C). (La flecha situada en la parte frontal de la caja del kit debe apuntar hacia arriba). NO REFIGERAR NI CONGELAR. Evitar el almacenaje en un lugar cercano a una ventana o a una fuente de calor. Evitar variaciones de temperatura importantes durante el almacenaje. Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit y en sus recipientes protectores.
Desechar el gel cuando:
(i) haya cristales o precipitados en la superficie del gel o su textura sea muy blanda (consecuencias de la congelación del gel),
(ii) se observe crecimiento bacteriano o fúngico,
(iii) se evidencie una cantidad excesiva de líquido en el recipiente del gel (consecuencia de la exudación del tampón debida a un almacenamiento inadecuado).

2. ESPONJAS TAMPONADAS

Preparación

Las tiras de esponja tamponadas están listas para su uso. Cada una contiene: tampón tris-barbital pH 8.7 ± 0.2 ; azida sódica ; aditivos, inocuos a las concentraciones utilizadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ATENCIÓN: El tampón de las esponjas contiene barbital 0.55 % y azida sódica 0.30 %. ¡No ingerir! ¡Si se ingiere consultar al médico inmediatamente! Al desechar evitar el contacto con ácidos, plomo o cobre, ya que se conoce su tendencia a formar compuestos explosivos o tóxicos en contacto con la azida sódica.

Uso

Las esponjas tamponadas funcionan como un reservorio del tampón de electroforesis y aseguran el contacto entre el gel y los electrodos.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Las esponjas tamponadas pueden conservarse a temperatura ambiente o en la nevera.
Deben ser conservadas horizontalmente en su bolsa protectora (la flecha situada en la parte frontal del kit debe apuntar hacia arriba).
Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en su bolsa protectora. NO LAS CONGELE.
Deseche las esponjas tamponadas si la bolsa está abierta o si las esponjas están secas.

3. DILUYENTE DEL COLORANTE (PN 4105 y 4125)

Preparación
El diluyente del colorante concentrado debe ser usado como se ha descrito en el párrafo "COLORANTE NEGRO AMIDO". Contiene una solución ácida.

Uso
Para la preparación del colorante negro amido.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro
El diluyente del colorante concentrado puede conservarse a temperatura ambiente o en la nevera. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de diluyente. NO LO CONGELE.
No le añada azida sódica.

4. COLORANTE NEGRO AMIDO (PN 4105 y 4125)

Preparación
El colorante negro amido concentrado es una solución viscosa que puede gelificarse, lo que no afecta de ningún modo a la calidad de la solución final y su capacidad de coloración.
Para obtener una perfecta reconstitución del colorante, siempre hay que prepararlo como se indica a continuación :

1. Añada unos 15 mL de diluyente del colorante en el vial de negro amido concentrado.
2. Cierre el vial con cuidado.
3. Agite el vial intensamente durante un mínimo de 5 segundos.
4. Vierta la solución obtenida en el recipiente de preparación de la solución de coloración.
5. Repita esta operación dos veces, o tres veces si es necesario.
6. Vierta el resto de diluyente en el recipiente de preparación de la solución de coloración.
7. Complete hasta 300 mL con agua destilada o desionizada.
8. Agite esta solución de 5 a 10 minutos.

El colorante está listo para usar.

NOTA : Una reconstitución incompleta del colorante puede implicar una mala coloración de la fracción albúmina (disminución de su porcentaje o aparición de un agujero blanco en el centro de la fracción).

Después de la dilución, la solución colorante contiene: solución ácida pH ≈ 2 ; negro amido, 4 g/L ; etilén-glicol, 6,7 % ; aditivos inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ATENCIÓN: Nocivo en caso de ingestión.

Uso
Para la coloración de los geles después de la separación electroforética de las proteínas.
IMPORTANTE: El colorante está destinado para colorear sólo 10 geles. Cambie el colorante después de 10 usos.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro
Las soluciones de colorante concentrada y diluida pueden conservarse a temperatura ambiente o en la nevera, en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de colorante.
La solución diluida es estable durante 1 mes. El período de estabilidad puede prolongarse a 3 meses si la solución diluida se conserva en nevera. Es imperativo colocar el contenedor cerrado en nevera inmediatamente después de cada uso.
No almacene la solución de colorante diluida cerca de una fuente de calor.

5. COLORANTE VIOLETA ÁCIDO (PN 4102 y 4122)

Preparación
Cada vial de la solución stock del colorante violeta ácido se diluye hasta 300 ml con agua destilada o desionizada.
Después de la dilución, la solución de trabajo del colorante contiene: solución ácida pH ≈ 2 ; violeta ácido, 0.2 g/dL ; etilén-glicol, 3.25 % ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ATENCIÓN: Es perjudicial si se ingiere.

Uso
Para la tinción de geles con separaciones electroforéticas de proteínas.
IMPORTANTE: El colorante está destinado para la coloración de 10 geles. Cambie el colorante después de su utilización en 10 coloraciones.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacenar las soluciones stock y de trabajo a temperatura ambiente o refrigeradas, en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución stock del colorante es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del vial. La solución de trabajo del colorante es estable durante 6 meses.

6. APLICADORES

Uso
Aplicadores precortados, de un solo uso, para la aplicación de la muestra.

Almacenamiento
Almacenar los aplicadores en un lugar seco a temperatura ambiente o refrigerados.

7. PAPELES DE FILTRO

Uso
Papeles de filtro finos absorbentes precortados, de un solo uso, para secar el exceso de humedad de la superficie del gel antes de la aplicación de la muestra.

Conservación
Les papeles de filtro finos deben conservarse en un lugar seco a temperatura ambiente o en la nevera.

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. SALINA

Preparación
Preparar una solución de NaCl 0.15 M (9 g/l) en agua destilada o desionizada.

Uso
Para diluir las muestras.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacenar a temperatura ambiente o refrigerada. Desechar después de 3 meses o si cambia su aspecto, por ejemplo, se vuelve turbia debido a contaminación microbiana. Para períodos de almacenaje más prolongados, añadir azida sódica, 1 g/l.

2. SOLUCIÓN DECOLORANTE

Preparación
Cada vial de la Solución Decolorante stock (SEBIA, PN 4540, 10 viales de 100 ml) se diluye hasta 100 litros con agua destilada o desionizada. Es conveniente diluir sólo 5 ml de la solución stock hasta 5 litros, volumen del contenedor de solución decolorante. Después de la dilución, la solución decolorante de trabajo contiene: ácido cítrico, 0.5 g/l.

Uso
Para desteñir, esto es, la eliminación del exceso de tinción y la coloración de fondo de los geles, y para enjuagar la cámara de tinción después de la limpieza con solución de lavado. Para neutralizar la acidez del decolorante, introduzca dentro del contenedor de desechos vacío 15 ml de sosa al 50 % (solución comercial).

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacenar la solución decolorante stock a temperatura ambiente o refrigerada. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del vial. La solución decolorante de trabajo es estable durante una semana a temperatura ambiente en una botella cerrada. No añadir azida sódica.
Desechar la solución decolorante de trabajo si cambia su aspecto, por ejemplo, se vuelve turbia debido a contaminación microbiana.
Para evitar la proliferación microbiana en la solución decolorante diluida que se vaya a almacenar durante más de una semana, añada 5 µl/dL de ProClin 300.
El decolorante diluido al que se ha añadido ProClin es estable en un contenedor cerrado a temperatura ambiente o en la nevera hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de decolorante.

3. SOLUCIÓN DE LAVADO HYDRASYS

Preparación
Cada vial de la Solución de Lavado HYDRASYS stock (SEBIA, PN 4541, 10 viales de 80 ml) se diluye hasta 5 litros con agua destilada o desionizada. Después de la dilución, la solución de lavado de trabajo contiene: tampón alcalino pH 8.8 ± 0.3 ; azida sódica.

ATENCIÓN: La solución de lavado stock contiene azida sódica 0.625 %. ¡No ingerir! ¡Si se ingiere consultar al médico inmediatamente! La azida sódica puede dar lugar a la formación de compuestos explosivos o tóxicos al entrar en contacto con ácidos, plomo o cobre. Lavar siempre con gran cantidad de agua al desechar.

Uso
Sirve para limpiar el Compartimento de Tinción del HYDRASYS. Utilizarla periódicamente, por ejemplo, si el instrumento se usa diariamente lavar el compartimento de tinción semanalmente.

El modo de empleo se encuentra en la hoja de instrucciones.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacenar las soluciones de lavado stock y de trabajo en contenedores cerrados a temperatura ambiente o refrigerados. Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.
Desechar la solución de lavado de trabajo si cambia su aspecto, por ejemplo, se vuelve turbia debido a contaminación microbiana.

4. FLUIDIL

Preparación
El Fluidil (SEBIA, PN 4587, 5 ml) está listo para su uso.

Uso
Para diluir muestras viscosas o turbias, por ejemplo, sueros que contengan crioglobulinas o criogeles.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacenar a temperatura ambiente o refrigeradas. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.
El Fluidil debe estar exento de precipitados.

EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Sistema HYDRASYS SEBIA, PN 1210 o PN 1211.
2. Micropipeteador, manual o automatico, como el HYDRAPLUS SEBIA, PN 1216 o HYDRAPLUS 2 SEBIA, PN 1217, para cargar los aplicadores de muestra de una forma alternativa.
3. Cámara de Almacenaje Húmeda, PN 1270, suministrada con el HYDRASYS.
4. Kit de Contenedores suministrado con el HYDRASYS.
5. Soporte del Gel para medios geles SEBIA, PN 1278.
6. Pipetas: 10 µl y 200 µl.
7. Densitómetro / escáner capaz de leer geles de 82 x 51 mm ó 82 x 102 mm a 570 nm o con un filtro amarillo, p. ej., HYRYS SEBIA, DVSE SEBIA o el programa PHORESIS para escáner de sobremesa. Observar las indicaciones del fabricante para los procedimientos de operación y calibración.
8. Materiales de control de calidad (Suero Control SEBIA, PN 4785).

MUESTRAS PARA ANÁLISIS

En el HYDRAGEL 7/15 HR se pueden analizar muestras de suero, orina o líquido cefalorraquídeo (LCR).
Las proteínas séricas también pueden cuantificarse después de la tinción con violeta ácido o negro amido.

Extracción y almacenamiento de muestras

Se recomienda analizar muestras frescas. Deben obtenerse conforme a los procedimientos establecidos de uso en el laboratorio clínico. Si es necesario, almacenar las muestras entre 2 y 8 °C hasta una semana. Las muestras congeladas son estables durante un mes por lo menos.
Las muestras de suero descongeladas pueden dar lugar a leves marcas de aplicación debidas a la desnaturalización de proteínas o lipoproteínas.
Congelar los sueros y LCR con azida sódica, 0.2 g/l, mejora la estabilidad del almacenaje.
Congelar las orinas con HEPES 0.1 M (pH 6.75) y azida sódica, 0.2 g/l, mejora la estabilidad del almacenaje. Las muestras descongeladas pueden dar lugar a leves marcas de aplicación debidas a la desnaturalización de proteínas.

IMPORTANTE: No utilizar ácido bórico como conservante.

Preparación de las muestras

1. Preparación de las muestras (análisis cualitativo)

Suero

Aplicar muestras de suero sin diluir. Bajo almacenaje entre 2 y 8 °C o después de la congelación, algunos sueros (particularmente aquellos que contengan crioglobulina o criogel) pueden volverse viscosos o desarrollar turbidez. Tales sueros podrían presentar problemas de aplicación debido a la difusión dificultada a través de los dientes del aplicador de muestra. En estos casos, añadir 25 µl de Fluidil a 75 µl de suero y agitar en el vórtex durante 15 segundos. Continuar entonces con el procedimiento habitual.

LCR o la pareja suero/LCR

Aplicar las muestras con una concentración total de proteínas de unos 10 g/l.

IMPORTANTE : El suero y el LCR deben presentar idéntica concentración total de proteínas.

Orinas

El análisis se lleva a cabo con orinas sin concentrar. Si se necesita una elevada sensibilidad, se puede aplicar la orina después de haberla concentrado.

- *Orinas no concentradas*: Aplicar la orina tal cual. Si la concentración de proteínas es muy elevada, es posible diluir la orina con salina para obtener una concentración de proteínas de unos 2 g/l, lo que proporciona un patrón más claro.
- *Orinas concentradas*: El análisis se realiza con muestras previamente concentradas hasta una concentración total de proteínas de unos 5 g/l.

IMPORTANTE: Algunas orinas contienen una elevada concentración de sales. Esto puede provocar la deformación del gel durante la migración y, por consiguiente, deformación de los perfiles de migración. Si tal deformación hace la interpretación inexacta, la orina debería dializarse para eliminar las sales.

NOTA : En caso de orinas turbias (concentradas o no), se recomienda eliminar las partículas, centrifugando las muestras (durante 10 minutos a 3000 rpm) o por filtración (en un filtro de 0,45 µm) para obtener una buena difusión en los aplicadores.

2. Preparación de las muestras (análisis cuantitativo)

Tinción con negro amido

Utilizar muestras de suero sin diluir.

Tinción con violeta ácido

Utilizar muestras de suero previamente diluidas 4 veces (1 vol./3 vol.) con salina. Seguir entonces con el procedimiento habitual.

Muestras a descartar

No usar muestras de suero hemolisadas. La hemólisis incrementa las fracciones alfa-2 y beta.
Evitar usar muestras de plasma. El fibrinógeno da lugar a una banda cerca del punto de aplicación que puede ser confundida con una inmunoglobulina monoclonal.

PROCEDIMIENTO

El sistema HYDRASYS es un instrumento semiautomático multiparamétrico. Las etapas automáticas incluyen el procesado de los geles de agarosa HYDRAGEL en la siguiente secuencia: aplicación de la muestra, migración electroforética, secado, tinción, decoloración y secado final. Las etapas manuales incluyen el manejo de las muestras y los geles, y la puesta en marcha del instrumento para el funcionamiento.
LEER CUIDADOSAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL HYDRASYS

I. PUESTA EN MARCHA DE LA MIGRACIÓN

1. Encender el HYDRASYS.
2. Colocar un aplicador en una superficie plana con los números de los pocillos en la cara superior (Fig. 1).
   - Aplicar 10 µl de muestra en cada pocillo. Cargar el aplicador en el plazo de 2 minutos.
   - Colocar el aplicador en la cámara de almacenaje húmeda con el peine hacia arriba [asirlo por el plástico protector del peine]. Dejar que las muestras difundan en los dientes del aplicador durante 5 minutos después de la última aplicación de muestra. Para un uso posterior (hasta 8 horas), mantener toda la cámara refrigerada. *Ver la hoja de instrucciones de la cámara húmeda para más detalles.*
3. Abrir la tapa del Módulo de Migración y elevar los soportes de los electrodos y el aplicador.
   ATENCION: ¡Nunca cerra la tapa mientras los soportes estén elevados!
4. Seleccionar el programa de migración en el menú del instrumento (lado izquierdo del teclado).
   - Análisis de suero : "7/15 HR1" para HYDRAGEL 7 HR y HYDRAGEL 15 HR.
   - Análisis de LCR o de LCR/suero : "7/15 HR2" para HYDRAGEL 7 HR y HYDRAGEL 15 HR.
   - Análisis de orina :
     1. Orinas no concentradas : "7/15 HR3" para HYDRAGEL 7 HR y HYDRAGEL 15 HR.
     2. Orinas concentradas : "7/15 HR2" para HYDRAGEL 7 HR y HYDRAGEL 15 HR.
5. Extraer las esponjas tamponadas de su envoltorio ; asirlas por los extremos de plástico. Engarzar los extremos de plástico agujereados con las puntas metálicas del soporte ; los extremos de plástico deben quedar encarados al soporte (Fig. 2).

6. Abrir el contenedor del HYDRAGEL.
   - Extienda un papel de filtro fino de manera rápida y uniforme sobre la superficie del gel para absorber el exceso de líquido. Retire el papel inmediatamente.

   ADVERTENCIA: Para evitar que se deshidrate, no deje que el papel de filtro contacte con el gel durante mucho tiempo.

   - Dispensar 120 µl de agua destilada o desionizada para el HYDRAGEL 7 HR o 200 µl para el HYDRAGEL 15 HR en el tercio inferior del marco serigrafiado en la Placa de Control de Temperatura del módulo de migración.
   - Colocar el gel (con el lado de agarosa hacia arriba) con su borde inferior en contacto con el tope inferior del marco serigrafiado (Fig. 3).
   - Aplicar el gel en la superficie, haciéndolo contactar con el agua (Fig. 3). Asegurarse de que no se formen burbujas de aire, que el agua esté extendida bajo toda la superficie del gel y que éste esté alineado con el marco serigrafiado.
7. Devolver ambos soportes a su posición original. En esta posición las esponjas tamponadas no tocan el gel. NO FORZAR LOS SOPORTES HACIA ABAJO.
8. Sacar el aplicador de la cámara húmeda. Asirlo por el plástico protector.
   - Romper el plástico protector de los dientes del peine.
   - Colocar el aplicador en la posición No 5 del soporte.

   IMPORTANTE: Los números impresos en el aplicador deben quedar de cara al usuario (Fig. 4).
9. Cerrar la tapa del módulo de migración.
10. Iniciar el procedimiento inmediatamente presionando la tecla «START» (flecha verde) situada en el lado izquierdo del teclado.

    IMPORTANTE: Asegurarse de que la toma de aire del lado derecho del instrumento no está bloqueada.

MIGRACIÓN - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Los dos soportes descienden, con lo cual las esponjas tamponadas y el aplicador entran en contacto con la superficie del gel.
- El soporte del aplicador se eleva.
- Programa de migración "7/15 HR1" y "7/15 HR2" : La migración se realiza a voltaje constante de 255 V a 20 °C, controlados por efecto Peltier, hasta que se hayan acumulado 75 Vh (durante unos 18 minutos).
- Programa de migración "7/15 HR3" : La migración se realiza a voltaje constante de 255 V a 20 °C, controlados por efecto Peltier, hasta que se hayan acumulado 40 Vh (durante unos 10 minutos).
- El soporte de los electrodos se eleva para desconectar los electrodos.
- La temperatura de la placa de control asciende hasta 60 °C durante 9 minutos para secar el gel.
- La placa de control es enfriada ; cuando alcanza 50 °C, un pitido indica que la tapa del módulo de migración se desbloquea. La temperatura de la placa permanece a 50 °C hasta que se abre la tapa. Entonces, la temperatura va descendiendo hasta que llega a 20 °C (en menos de 5 minutos), momento en el que se puede comenzar una nueva migración.

NOTA: La tapa del módulo de migración permanece cerrada durante todas las etapas de la migración.

II. PUESTA EN MARCHA DEL PROCESADO DEL

1. Abrir la tapa.
2. Sacar el aplicador y desechar.
3. Elevar ambos soportes, extraer las esponjas tamponadas por sus extremos de plástico y desechar.
4. Retirar el gel secado para su procesado posterior.
5. Después de cada uso limpiar los electrodos y la placa de control de temperatura con un pañuelo de papel suave humedecido.
6. Abrir el Soporte del Gel. Colocar el gel secado (con el lado de agarosa hacia arriba) en los orificios de las dos varillas y cerrar el soporte. Asegurase de que el gel está colocado correctamente en el soporte (Fig. 5).
7. Colocar el soporte del gel en el Módulo de Procesado / Tinción.

   IMPORTANTE: Antes de iniciar el programa de procesado / tinción, comprobar lo siguiente:
   - el contenedor de colorante contiene 300 ml de colorante ;
   - el contenedor de decolorante contiene como mínimo 1 litro de solución decolorante ;
   - el contenedor de deshechos está vacío.

   Para conocer en qué posiciones conectar los reactivos: consultar la información que aparece en la pantalla del instrumento (seleccionar la tecla: VER CANALES).

   IMPORTANTE: No olvidar bloquear los canales no utilizados.
8. Seleccionar el programa de tinción "HR ACID VIOLET" o "HR AMIDO" en el menú del instrumento e iniciar el proceso presionando la tecla "START" (flecha verde situada en el lado derecho del teclado).

   Durante la tinción, la decoloración, el lavado y el secado del gel el compartimento permanece bloqueado.
   Después del enfriamiento de la cubeta, una señal sonora (bip) suena y el sistema se desbloquea (la ventilación se mantiene hasta la recuperación del porta-films).

III. FINALIZACIÓN DEL PROCESADO DEL GEL

1. Retirar el soporte del gel del compartimento, abrirlo y extraer el gel ya seco.

   NOTA : Si se observan manchas azules residuales en los geles después de la coloración / decoloración, una etapa de lavado suplementario con el programa "LAV. ISOENZ/GEL" permite eliminarlas o atenuarlas (según su intensidad) antes de su lectura en densitómetro o escáner.
2. Si es necesario, limpiar el reverso del gel (el lado de soporte de plástico) con un papel suave y húmedo.

RESULTADOS

Control de calidad

Se aconseja incluir una muestra normal o un suero control (Suero Control de Proteínas, SEBIA, PN 4785) en cada análisis de muestras.

Valores (análisis cuantitativo)

La lectura densitométrica (a 570 nm) de las separaciones electroforéticas teñidas proporciona las concentraciones relativas (porcentajes) de las fracciones de proteína individuales.
Los valores normales (media ± 2 SD) de las fracciones electroforéticas principales de las proteínas séricas en los geles HYDRAGEL 7/15 HR han sido establecidos a partir de una población sana integrada por 225 adultos (hombres y mujeres):

FRACCIÓN	HYRYS - GELSCAN	PHORESIS
Albúmina	56.2 - 69.0	57.5 - 67.9
Alfa-1 globulinas	1.2 - 3.2	1.0 - 3.8
Alfa-2 globulinas	7.8 - 13.4	7.2 - 12.8
Beta globulinas	7.4 - 13.4	7.6 - 13.6
Gamma globulinas	9.8 - 18.6	10.3 - 18.3

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de normalidad.

Interpretación

La interpretación es cualitativa.

PROTEÍNAS SÉRICAS [6]

La interpretación se realiza comparando los electroforetogramas de la muestra clínica y un control normal. En caso de que exista alguna fracción aumentada, disminuida o adicional, normalmente es necesario confirmar los cambios observados mediante otras pruebas tales como la cuantificación de proteínas específicas, inmunoelectroforesis, o inmunofijación.
Entre las numerosísimas proteínas plasmáticas, sólo alrededor de quince existen en cantidad suficiente para ser visualizadas en los geles de Alta Resolución (HR). La importancia del gel HYDRAGEL 7/15 HR está en su sensibilidad en la zona catódica, que permite la detección de bandas monoclonales u oligoclonales débiles. La interpretación es esencialmente cualitativa.

PROTEÍNAS DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO [4,6,11,12,13]

Cualquier banda adicional detectada en la fracción gamma del LCR, sin ninguna fracción correspondiente en el suero debe ser confirmada mediante un procedimiento de inmunofijación (HYDRAGEL 3/6 CSF SEBIA o kits de inmunofijación SEBIA, HYDRAGEL 1/2/4/9 IF SEBIA), con el fin de caracterizar la síntesis intratecal. La confirmación inmunológica es necesaria porque es posible detectar en la fracción gamma bandas que no corresponden a inmunoglobulinas (fracción tau, anhidrasa carbónica, pos gamma, o PCR, por ejemplo).

NOTA : La interpretación es estrictamente comparativa. Es por lo tanto absolutamente necesario:

- *Analizar los fluidos biológicos (LCR / suero) obtenidos al mismo tiempo sin ningún tratamiento que pudiese modificar la concentración de Ig G en el suero.*
- *Aplicar cantidades idénticas de proteínas o de inmunoglobulinas en las 2 muestras. Por lo tanto es necesario realizar una cuantificación previa con una buena precisión y reactivos apropiados.*

El líquido cefalorraquídeo (LCR) es un líquido biológico con una concentración de proteínas baja. La cantidad de proteína en un LCR normal es de unos 0.30 g/l ± 0.15. La mayoría de proteínas del LCR tiene su origen en el suero, desde donde son filtradas y transportadas a través de la barrera hematoencefálica. Para analizarlo en los geles HYDRAGEL 7/15 HR, el LCR debe estar concentrado hasta unos 10 g/l.

Un patrón de LCR normal muestra el siguiente orden de fracciones:

- Prealbúmina, o transtiretina, la fracción más rápida ;
- Albúmina, la fracción predominante, que representa alrededor del 75 % del total de proteínas ;
- Fracción alfa-1, integrada principalmente por la alfa-1 antitripsina ;
- Alfa lipoproteínas ;
- Fracción alfa-2, que contiene ante todo proteínas de alto peso molecular ; por consiguiente, es muy débil ya que las proteínas no pueden atravesar la barrera hematoencefálica ;
- Fracción beta, que contiene transferrina ;
- Fracción beta-2, que contiene ante todo transferrina «específica de LCR», la fracción tau, una forma de transferrina que carece de un carbohidrato (ácido siálico) ;
- Fracción gamma, que esencialmente contiene Ig G, y a veces Ig A e Ig M.

Muchos estudios han mostrado un incremento de inmunoglobulinas procedentes de una síntesis dentro del Sistema Nervioso Central. La estimulación antigénica de esta producción de Ig G no ha sido explicada todavía. Se han propuesto hipótesis que hablan de infecciones víricas y reacciones autoinmunes.
Junto a la Esclerosis Múltiple, un aumento de Ig G puede ser detectado durante la enfermedad desmielinizante infantil, panencefalitis esclerosante subaguda y también durante otros desórdenes inflamatorios e infecciosos.

La esclerosis múltiple se detecta mediante múltiples bandas monoclonales que revelan un aspecto oligoclonal de las gammaglobulinas. Estas anormalidades aparecen muy pronto durante el curso de la enfermedad. La intensidad de las diferentes bandas puede variar desde muy débil a muy fuerte.
Este aspecto oligoclonal ha sido encontrado también durante otros desórdenes del sistema nervioso central (enfermedades infecciosas inflamatorias o no). Se han detectado múltiples bandas durante la panencefalitis esclerosante, neurosífilis, encefalitis vírica, meningoencefalitis y meningitis bacteriana. También se han encontrado, pero raramente, en la neuropatía periférica, tumores, hidrocefalia, enfermedades degenerativas y desórdenes vasculares. Todos estos casos no deben ser considerados como falsos positivos, sino como una indicación de una actividad inmunológica aumentada del sistema nervioso central. Se recomienda encarecidamente que tales LCR sean analizados simultáneamente con el suero del paciente (a la misma concentración de proteínas, esto es unos 10 g/l). En algunas anormalidades linfoproliferativas se puede detectar un aspecto oligoclonal tanto en el suero como en el LCR.
Cualquier patrón oligoclonal tiene que ser confirmado mediante investigaciones posteriores con kits de inmunofijación:

- HYDRAGEL 1 IF SEBIA (PN 4301), HYDRAGEL 2/4 IF, SEBIA (PN 4302, 4304, 4308),
- HYDRAGEL 9 IF, SEBIA (PN 4309),
- HYDRAGEL 3/6 CSF, SEBIA (PN 4350, 4351),
- HYDRAGEL 1 BENCE JONES, SEBIA (PN 4321), HYDRAGEL 2/4 BENCE JONES, SEBIA (PN 4322, 4324).

ORINA [1,2,3,5,7,8,9,10,14,15]

La electroforesis de orina se realiza con el fin de detectar componentes monoclonales.
El HYDRAGEL 7/15 HR se utiliza como un sistema de despistaje de proteínas urinarias. Permite la detección de componentes monoclonales que deben identificarse mediante inmunofijación, y la detección de proteínas de origen tubular, glomerular o mixto que deben ser caracterizadas con métodos adecuados (filtración molecular en tampón SDS o medidas nefelométricas específicas o inmunofijación con anticuerpos apropiados).

Interferencias y Limitaciones
Las lipoproteínas LDL y HDL son moléculas complejas con una movilidad electroforética natural muy variable desde la zona beta a la zona alfa-2.
Para evitar dificultades de integración e interpretación, los geles HYDRAGEL tienen una composición particular que coloca generalmente las HDL en la zona alfa-2 y las LDL en la zona beta.
Sin embargo, esta migración es muy sensible a los siguientes factores:
- tiempo de almacenamiento de la muestra,
- concentración de lipoproteínas,
- tratamientos con medicamentos (por ejemplo con heparina),
- estado de hidratación del gel (conservación del gel),
- variaciones, incluso muy leves, de las materias primas.

Por estas razones, puede observarse un ligero desplazamiento anódico de estas lipoproteínas, que se vuelven más aparentes o que implica un ensanchamiento de la fracción, incluso un desdoblamiento de la zona alfa-2 y / o de la zona beta.
1) Los porcentajes de las fracciones alfa-2 y beta permanecen inalterados a pesar del leve desdoblamiento debido a la variación de la movilidad electroforética.
2) La forma característica de la fracción de beta-lipoproteína (con una focalización importante y una forma irregular) no puede en ningún caso provocar un error de interpretación, sólo cambia su aspecto.

Las muestras de suero descongeladas pueden dar lugar a leves marcas de aplicación debidas a la desnaturalización de proteínas o lipoproteínas.
No usar muestras de suero hemolisadas.
Evitar usar muestras de plasma.
Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución y sensibilidad), no puede darse ninguna garantía respecto a la detección de la totalidad de todos los componente monoclonales.

Resolución de problemas
Avisar al Servicio de Atención Técnica del distribuidor cuando el test no funcione, pese a haber seguido cuidadosamente las instrucciones para la preparación y almacenaje de los materiales y para el procedimiento a seguir.
Las hojas de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como las informaciones relativas a la eliminación de los desechos, están disponibles en el Servicio de Asistencia Técnica de su distribuidor.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Se usaron materiales, preparación de las muestras y procedimientos estándar. Todas las separaciones electroforéticas fueron evaluadas visualmente.

Análisis cualitativo
Los resultados obtenidos con los geles HYDRAGEL 7/15 HR indican una muy buena reproducibilidad intra e interserial en todos los aspectos probados y no hubieron diferencias detectables visualmente entre las réplicas.
Se analizaron muestras patológicas y normales de suero, parejas LCR/suero y orina procedentes de 116 pacientes en geles HYDRAGEL 7/15 HR y en un sistema comercial comparable de geles de alta resolución. Las muestras se prepararon como se recomienda en los procedimientos respectivos.
Los parecidos / diferencias de los patrones electroforéticos y la presencia de bandas monoclonales u oligoclonales fueron los aspectos comparados.
La comparación visual o cualitativa entre estas dos pruebas se ha basado en el número de bandas y su posición.
Los resultados de los dos procedimientos concordaron en las 116 muestras y eran consecuentes con el diagnóstico clínico.

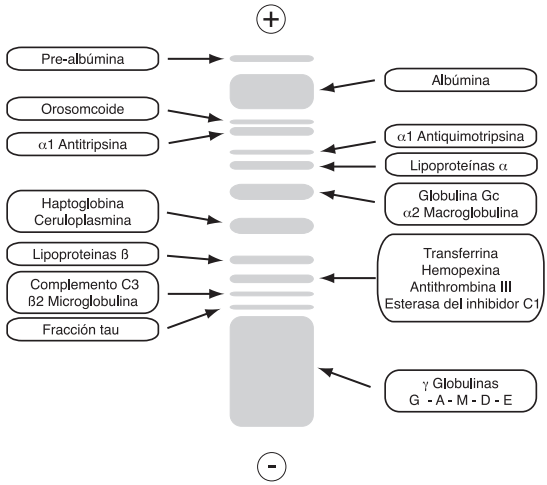
Análisis semicuantitativo
En las aplicaciones semicuantitativas, los resultados obtenidos con los geles HYDRAGEL 7/15 HR indican una muy buena reproducibilidad intra e interserial en todos los aspectos probados y no hubieron diferencias detectables visualmente entre las réplicas ; el CV medio era 4.0 %.
Los procedimientos HYDRAGEL 7/15 HR con las opciones de tinción con violeta ácido y negro amido fueron comparados con otro procedimiento comercial de geles de alta resolución (separaciones de alta resolución tradicionales de las proteínas séricas y tinción con violeta ácido).
Para una mejor comparación, todas las separaciones electroforéticas fueron leídas (con un filtro amarillo) como separaciones de 5 fracciones.
Se analizaron muestras de suero clínicas (n = 56) con cada procedimiento y se compararon las concentraciones relativas de cada fracción usando un análisis de regresión lineal, siendo 0.973 el coeficiente de correlación medio en todas las fracciones proteicas con ambas soluciones de tinción.

	HYDRAGEL 15 HR (violeta ácido)				HYDRAGEL 15 HR (negro amido)			
FRACCIÓN	Coeficiente de correlación	Pendiente	Intersección en y	Gama (%) (HYDRAGEL 15 HR)	Coeficiente de correlación	Pendiente	Intersección en y	Gama (%) (HYDRAGEL 15 HR)
Albúmina	0.981	0.98	1.89	36.7 - 66.1	0.985	0.96	2.35	36.1 - 67.4
Alfa-1	0.976	0.99	-0.11	1.5 - 7.5	0.982	0.97	-0.03	1.3 - 7.1
Alfa-2	0.982	0.98	-0.14	6.8 - 24.5	0.978	0.96	0.31	5.7 - 24.2
Beta	0.956	0.91	0.90	5.8 - 19.8	0.918	0.95	0.41	5.4 - 20.0
Gamma	0.991	0.99	-0.16	8.3 - 40.0	0.990	0.94	1.05	7.2 - 37.5

Sensibilidad
La sensibilidad se determinó a partir de la máxima dilución seriada que proporcionaba una banda distinguible. En los programas "HR1" y "HR2" la sensibilidad de detección fue de 100 - 300 mg/l para una proteína monoclonal (G, Kappa).
En el programa "HR3", la sensibilidad de detección fue de 15 - 20 mg/l (albúmina y proteína de Bence Jones). Se observaron aproximadamente las mismas sensibilidades al utilizar negro amido y violeta ácido como colorantes.
NOTA: El límite de detección puede variar en función de la posición de la banda monoclonal y el fondo policlonal de la fracción de las gammaglobulinas.

Linealidad
Los métodos fueron lineales hasta al menos 58 g/l de albúmina y 39 g/l de Ig G para ambos procedimientos de tinción.

PATRON DE MIGRACIÓN



BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAPHY

(1) Cameron JS. 1987. The nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis*, 10 : 157-171.
(2) Chopin N. 1991. Étude de la protéinurie. *Inf Tech Biol*, 1 : 23-28.
(3) Cohen R, François B, Sabot JF, Bernard P, Picq JP, Adeleine P. 1985. Étude comparative de l'immunoélectrophorèse urinaire et de quatre index de sélectivité glomérulaire au cours des glomérulopathies chroniques. *Path Biol*, 33 : 23-26.
(4) Davenport RD, Keren DF. 1988. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluids, significance of corresponding bands in serum for diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Chem*, 34 : 764-765.
(5) Joachim GR, Cameron JS, Chwartz M, Belker EL. 1964. Selectivity of protein excretion in patients with the nephrotic syndrome. *J Clin Invest*, 43, 2332-2346.
(6) Keren DF, "High resolution electrophoresis and immunofixation techniques and interpretation", Butterworth-Heinemann, Woburn, MA, USA, 1994, 397 pp.
(7) Laurell DB. 1972. Comparison and variation of the gel electrophoresis fractions of plasma cerebrospinal fluid and urine. *Scand J Clin Lab Investigation,* 29 : 71-82.
(8) Le Carrer D. 1990. Protéinuries : Mise au point sur leur exploration biologique en 1990. *L'Eurobiologiste*, 190 : 395-405.
(9) Le Carrer D, Chopin N. 1994. Profil protéique urinaire : Proposition d'un protocole d'exploration biologique des protéinuries. *Revue française des laboratoires*, 269 : 29-37.
(10) Le Carrer D, Nicolas A, Ducasse L. 1992. L'analyse des protéinuries au laboratoire de biologie en 1992. *Revue française des laboratoires*, 225 : 41-47.
(11) Linstedt G, Lindberg PA. 1974. Loss of tubular proteinuria pattern during urine concentration with a commercial membrane filter cell. *Clin Chem Acta*, 56 : 125-126.
(12) Olsson JE, Link M. 1973. Immunoglobulin abnormalities in multiple sclerosis. 1973. *Arch Neurol*, 28 : 392-399.
(13) Papadopoulos NM, Costello R, Kay AD, Cuttler NR, Papoport SL. 1984. Combined immunochemical and electrophoretic determination of protein in paired serum and cerebrospinal fluid samples. *Clin Chem*, 30 : 1814-1816.
(14) Pearson SD, Wu JT. Sensitive, specific detection of oligoclonal banding in cerebrospinal fluid by agarose gel electrophoresis. 1989. *Clin Chem*, 35 : 1997.
(15) Philipon C. 1989. Protéines urinaires : Intérêt clinique et interprétation. *Technique et Biologie*, 6 : 239-249.
(16) Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. 1989. Current concepts in proteinuria. *Clin Chem*, 35 : 755-765.
(17) Wendling A. Procédures de diagnostic ou de dépistage : Justification et validité d'un test de diagnostic ou de dépistage-sensibilité-spécificité. *Impact-Internat*, 1986 ; Sept : 93-97.

SCHÉMAS / FIGURES

Figure 1

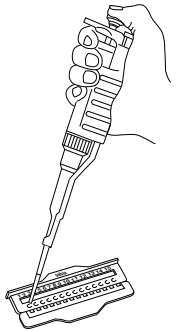


Figure 2

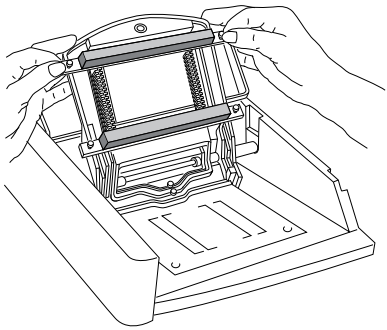


Figure 3

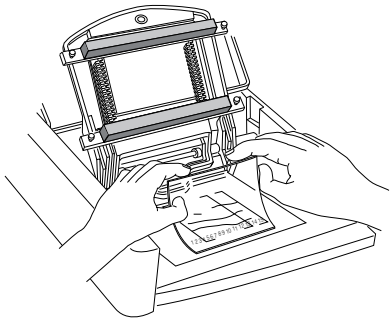


Figure 4

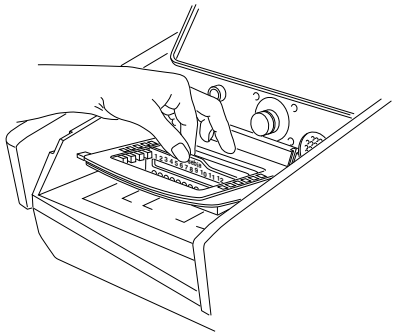
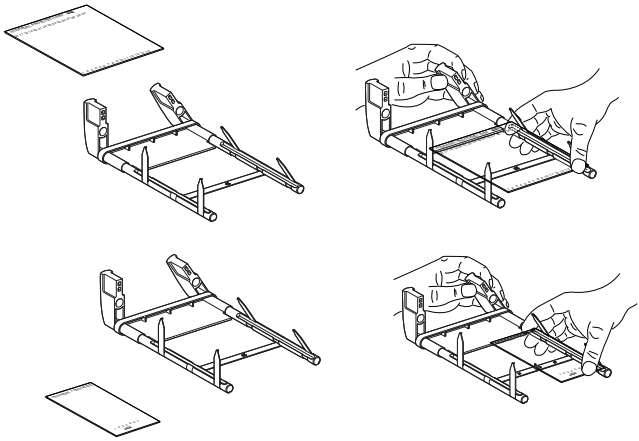



Figure 5